

## ClearV 488 Caspase-3 Assay Kit for Live Cells

### ClearV 488 Caspase-3 活细胞检测试剂盒

#### 产品简介

ClearV 488 Caspase-3 活细胞检测试剂盒包含 ClearV 488 Caspase-3 底物和 Ac-DEVD-CHO Caspase-3/7 抑制剂。ClearV 488 Caspase-3 Substrate 基于 Caspase-3/7 活力检测细胞凋亡，适用于荧光显微观察和流式细胞仪分析。

相较于其它基于 FLICA 分析的试剂盒，试剂盒内提供的 Substrate 在检测 Caspase-3/7 活性的同时不会抑制完整细胞的凋亡过程。Substrate 由耦合 Caspase-3/7 DEVD 识别序列的荧光 DNA 染料组成。Substrate 最初无荧光，其会穿过细胞膜进入细胞质。在凋亡细胞中 Caspase-3/7 剪切 Substrate 释放高亲和性的 DNA 染料，这种染料迁移到细胞核标记 DNA 并发出明亮的绿色荧光。Substrate 是双功能的，既可以检测 Caspase-3/7 活性，又能可视化细胞核在细胞凋亡进行中的形态学变化。ClearV 染色可以进行甲醛固定并兼容后续免疫染色实验。

光谱特性 ClearV : Ex/Em=500/530nm (with DNA)

#### 产品规格

|    |                   |
|----|-------------------|
| 货号 | C331409E/C331409S |
| 规格 | 25 T/100 T        |

#### 组分信息

| 组分编号      | 组分名称                                           | C331409E    | C331409S    |
|-----------|------------------------------------------------|-------------|-------------|
| C331409-A | ClearV 488 Caspase-3 Substrate, 0.2 mM in DMSO | 125 $\mu$ L | 500 $\mu$ L |
| C331409-B | Caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-CHO, 2 mM in DMSO  | 20 $\mu$ L  | 100 $\mu$ L |

#### 储存条件

冰袋 (wet ice) 运输。储存于 4°C，至少可以储存 12 个月。

#### 注意事项

1. 细胞可用 Hoechst 33342 染料（推荐浓度 1  $\mu$ M）共染，使细胞核产生蓝色荧光染色（Ex/Em=346/460 nm）。
2. ClearV 488 染料可用甲醛固定，但与甲醇固定不兼容。
3. 经甲醛固定的 ClearV 488 染色细胞可用 0.1% TritonX-100 处理后进行后续染色，但这样处理后的染色亮度可能会减弱。

4. 操作时请采取防护措施，穿防护服、戴一次性手套等。
5. 本产品仅用于科研。

## 使用说明

### 1. 实验优化

下面提供的实验步骤根据终点法检测制度。ClearV 488 Substrate 可进行细胞长时间孵育过程研究。细胞密度、底物浓度和抑制剂浓度可能需要优化。推荐底物浓度 1-10  $\mu\text{M}$  之间。细胞可在培养基、PBS 或其他的缓冲液中孵育底物。对于贴壁细胞，建议更换新鲜含有底物的培养基，以防背景的不均一性。底物孵育后换液或洗涤细胞等操作可自由选择。

### 2. 对照设定

推荐设定以下对照：

- A. 阴性对照：不诱导凋亡的细胞
- B. 阳性对照：诱导凋亡的细胞
- C. 抑制剂对照：诱导细胞凋亡同时（或提前 10-30 min）孵育 Caspase-3/7 抑制剂，最后再添加 ClearV 488 Caspase-3 底物。

### 3. 抑制剂对照

试剂盒中所提供的 Caspase-3/7 抑制剂 Ac-DEVD-CHO 可用来确认 Caspase-3/7 依赖于 ClearV 488 的荧光信号。对于抑制剂对照，抑制剂的终浓度应至少是底物浓度的 2 倍（例如当使用 5  $\mu\text{M}$  ClearV 488 底物时，Ac-DEVD-CHO 浓度为 10  $\mu\text{M}$ ）。添加底物前在室温下孵育 Ac-DEVD-CHO 15-30 min，加入底物后，孵育液中继续保留抑制剂。Ac-DEVD-CHO 是可逆的竞争性抑制剂。对于某些细胞类型有效的 Caspase-3/7 抑制剂需要使用不可逆的抑制剂，如 Z-DEVD-FMK，或需要在凋亡诱导之前或诱导过程中添加抑制剂。

### 4. 流式细胞仪分析

- 1) 选择合适的方法诱导细胞凋亡，未经处理的细胞样本作为对照。
- 2) 对于贴壁细胞，实验前先用胰蛋白酶或其他方法消化细胞。
- 3) 用细胞培养基或合适缓冲液重悬细胞，使细胞密度达到  $10^6$  个/mL 数量级。
- 4) 添加 200  $\mu\text{L}$  细胞悬液至流式细胞试管。
- 5) 抑制剂对照样本，用 Ac-DEVD-CHO 处理细胞（见上文）。
- 6) 200  $\mu\text{L}$  细胞悬液中加 5  $\mu\text{L}$  0.2 mM 的 Substrate 并立即混匀使底物浓度为 5  $\mu\text{M}$ 。不同类型细胞最佳底物浓度可能不同，需进一步优化。
- 7) 室温避光孵育 15-30 min。
- 8) 加入 300  $\mu\text{L}$  细胞培养基或 PBS，使用流式细胞仪分析，选择检测绿色荧光的通道（激发/发射：485/515 nm）。

## 5. 荧光显微镜观察

- 1) 选择合适的方法诱导细胞凋亡，未经处理的细胞样本作为对照。
- 2) 抑制剂对照样本，用 Ac-DEVD-CHO 处理细胞（见上文）。
- 3) 用含 5  $\mu$ M Substrate 的新鲜培养基或 PBS 对细胞进行换液（见试验优化）。对于抑制剂对照组，抑制剂与底物一同孵育。
- 4) 室温孵育 30 min 或更长时间。
- 5) PBS 或其它缓存液清洗细胞，荧光显微镜观察细胞，使用观察绿色荧光的滤片（激发/发射：485/515 nm）。

## 6. 荧光酶标仪检测

- 1) 将贴壁细胞生长在黑色 96 孔板中；对于悬浮细胞，调整密度至  $10^6$  个/mL，每孔加入 0.2 mL 细胞悬液。
- 2) 选择合适的方法诱导细胞凋亡，未经处理的细胞样本作为对照。

**【注意】**细胞可能在管或瓶中处理，然后转移到 96 孔检测板。

- 3) 抑制剂对照样本，用 Ac-DEVD-CHO 处理细胞（见上文）。
- 4) 对于悬浮细胞，直接添加 Substrate 混匀。对于贴壁细胞，用含有 5  $\mu$ M Substrate 的新鲜培养基或 PBS 对细胞进行换液（见试验优化）。对于抑制剂对照组，抑制剂与底物一同孵育。
- 5) 细胞可以在含有 Substrate 的培养基中直接观察。
- 6) 对于悬浮细胞，轻轻震荡重悬细胞。荧光酶标仪设置激发波长 488 nm 和发射波长 520 nm。建议贴壁细胞使用底部阅读方式。贴壁细胞密度的变化可能导致不准确的读数。